

様式 1-5

種目（一般研究Ⅰ）

漢方方剤・生薬由来新規抗マalaria薬の探索

申請代表者	平山 謙二	長崎大学 熱帯医学研究所 免疫遺伝学分野	教授
所外共同研究者	水上 修作	長崎大学 熱帯医学研究所 免疫遺伝学分野	助教
	Awet Alem	長崎大学 熱帯医学研究所 免疫遺伝学分野	大学院生
	Teklemichael		
所内共同研究者	當銘 一文	資源開発研究部門 生薬資源科学分野	准教授
	小松 かつ子	資源開発研究部門 生薬資源科学分野	教授

■背景・目的

マalariaは代表的な蚊媒介性の感染症であり、マalaria原虫が宿主の肝臓内で増殖した（肝内期）後に赤血球に感染する（血中期）という生活環を持つ。2015年のWHOによる報告では、全世界で32億人もの人々がマalaria感染のリスクに晒されており、年間約2億件の感染と40万人以上の死亡者が報告されている。また、その大多数がサハラ以南アフリカで生じている（感染症例数の89%、マalaria関連死者数の91%）。現在、マalariaに対して十分な有効性を持つワクチンは開発されておらず、そのため、これまでに多くの抗マalaria薬が使用されてきた。しかしながら、耐性を獲得しやすいマalariaの性質の為、近年多く使用されているアルテミシニンに対しても既に耐性株が発見されており、未だに新たな抗マalaria薬が求められているのが現状である。

前述のアルテミシニンがヨモギ属の植物クソニンジン（チンハオス）から生まれたように、感染症分野においても、伝承医薬は医薬品ソースの宝庫と考えられている。我々も、国内外の伝承薬物について、抗マalaria薬になり得るのではないかと長年興味を持っていた。本研究開始までに、平成27-28年度に和漢医薬学総合研究所から提供された和漢薬ライブラリー（生薬由来化合物・生薬熱水抽出エキス）を用いた抗マalaria活性のスクリーニング研究を行った。その結果、ライブラリーに含まれる複数の化合物・抽出エキスが抗マalaria活性を有することが明らかになった。

今回我々は、富山大学和漢医薬学研究所提供の和漢薬ライブラリーに含まれる抗マalaria活性を持つ化合物・生薬のより詳細な検討を行った。また、これに加えて、抗マalaria活性を持つ化合物・生薬を含む漢方方剤の抗マalaria効果を、*in vitro*及び*in vivo*（マウス）の実験系を用いて検討した。これは、既存の漢方方剤をマalaria対策に利用できるならば、抗マalaria薬開発を通常の医薬品開発と比べて短期間で行なえる可能性があると考えたためである。本研究の結果は、新規抗マalaria薬開発に大きく寄与するものとする。

■結果・考察

① 和漢薬ライブラリーの抗マalaria活性の検討： 各サンプル（化合物96種、生薬エキス120種）の抗マalaria活性を、赤血球期マalariaのモデルとなる*in vitro*実験系を用いて検討した。

方法：まず熱帯熱マalaria原虫（クロロキン/メフロキン感受性(3D7A)株）に感染したヒト赤血球（ヘマトクリット2%、感染率0.75%）を96ウェルクリアボトムブラックプレートに準備した。ここに、和漢薬ライブラリーに含まれる化合物及び生薬エキスを加え、37%インキュベーター内に置かれた混合ガス（90% N₂, 5% O₂, 5% CO₂）で満たされたジャーの中で48時間培養を行った。その後、SYBR Green Iを用いたDNA蛍光染色によりマalaria原虫を検出し、コントロールとの蛍光強度の比較により、各サンプルのマalaria阻害率を算出した。

この検討は 2 段階で行われ、1 次試験（スクリーニング）では一定濃度のサンプル（化合物 10 μ M・生薬エキス 500 μ g/mL）を用いた処理を行った。その結果、50 %以上の阻害活性を示したサンプルのみを続く 2 次試験で検討した。2 次試験では、段階希釈した各サンプルでマラリア感染赤血球を処理し、1 次試験同様に阻害率を算出した。この結果から、マラリアを 50%阻害する濃度(IC₅₀: 50% inhibitory concentration)を算出した。

2 次試験では、各サンプルの持つ細胞傷害性の検討も adult mouse brain (AMB)細胞を用いて行った。本実験でも段階希釈したサンプルでの細胞の処理を行い、細胞を 50%傷害する濃度(CC₅₀: 50% cytotoxic concentration)及び安全性の指標としての selectivity index(SI, CC₅₀/IC₅₀)の算出を行った。

また、これらの実験結果から優れた抗マラリア活性を持ちかつ安全性も高いと考えられた化合物・生薬エキスについては、クロロキン/メフロキン耐性(Dd2)株に対しての活性検討も行った。

結果：2 次試験に用いたサンプルのうち化合物 7 種、生薬エキス 27 種について（化合物<10 μ M、生薬エキス<500 μ g/mL の）IC₅₀ が得られた。（この内、IC₅₀が化合物で 10 μ M 以下、生薬エキスで 100 μ g/mL 以下のサンプルの結果を、表 1, 2 に示した。（なお一部化合物・生薬エキス名は、今後の特許出願の可能性のため、伏せた。）

考察：化合物では、IC₅₀が 10 μ M 以下を示した 7 化合物のうち、coptisine chloride, shikonin, berberine chloride, alkanin の IC₅₀が 5 μ M 未満であったが、coptisine chloride 以外の 3 化合物は、CC₅₀も低値であったため、安全性が懸念された。これに対して coptisine chloride は、IC₅₀が最も低く CC₅₀も他の化合物と比較して高かったことに加えて、Dd2 に対しても抗マラリア活性を示した。その IC₅₀は、3D7A に対してのものよりは高値であったが、クロロキンではその数値が 10 倍程度高くなる（実験結果非掲載）ことを考えると、その数値は十分に低いものであると考えられた。Compound X および palmatine chloride は、IC₅₀は他と比べて低いものではないが、CC₅₀は 100 μ M より大きく、安全性は高いものと考えられた。また、coptisine chloride, berberine chloride に palmatine chloride を加えた 3 種の berberine 誘導体化合物がいずれも低い IC₅₀を示したことも、特筆すべき実験結果であったと考える。

生薬エキスでは、IC₅₀が 100 μ g/mL 以下を示した 7 生薬エキスのうち、黄連の IC₅₀のみが 10 μ g/mL 未満であり、また強い細胞傷害性も認められなかった。

黄連は成分として coptisine, berberine, palmatine を含むことから、化合物・生薬エキスを用いたそれぞれの実験結果にも相関が認められた。このため、続いて黄連を含む漢方方剤から、今後の検討に使用する漢方方剤を選定することとした。

化合物名	IC ₅₀ (μ M)		CC ₅₀ (μ M)	SI	
	3D7A	Dd2		3D7A	Dd2
Coptisine chloride	1.1	3.1	41.6	37.8	13.2
Shikonin	1.9		5.1	2.7	
Berberine chloride	2.6		8.5	3.3	
Alkanin	2.9		5.8	2.0	
Compound X	5.3	13	> 100	> 18.9	> 7.6
Palmatine chloride	6.0	12	> 100	> 16.7	> 8.7
Costunolide	9.4		18.2	1.9	

表 1：抗マラリア活性を示した化合物一覧（IC₅₀< 10 μ M）

生薬名	IC ₅₀ (μg/mL)		CC ₅₀ (μg/mL)	SI	
	3D7A	Dd2		3D7A	Dd2
黄連	2.5	3.2	> 500	> 200	> 153.8
生薬 Y	10.0		> 500	> 50.0	
黄柏	10.3		23.5	> 2.3	
丁子	26		> 500	> 19.2	
樸榔	62		> 500	> 8.1	
大黄	77		> 500	> 6.5	
胡麻	78		> 500	> 6.4	

表 2：抗マラリア活性を示した生薬エキスイ覧（IC₅₀< 100 μg/mL）

② 黄連を含む漢方方剤の抗マラリア効果の検討：

1) 漢方方剤の選定

黄連を含む漢方方剤（表 3）から、今回はその含有率を基準に、三黄瀉心湯及び黄連解毒湯を検討に使用する方剤として選定した。

生薬名	方剤名	黄連含有率 (%)
黄連	三黄瀉心湯	40.00
	黄連解毒湯	33.30
	黄連湯	13.60
	柴胡清肝湯	8.10
	荊芥連翹湯	7.70
	温清飲	6.25
	半夏瀉心湯	4.76
	竹筴温胆湯	3.30

表 3：黄連を含む漢方方剤とその黄連含有率

2) *In vitro* 実験での抗マラリア活性の検討

方法：①と同様の方法で、三黄瀉心湯及び黄連解毒湯の抗マラリア活性及び細胞傷害性の検討を行った。

3D7A 及び Dd2 に対する IC₅₀ と AMB 細胞に対する CC₅₀ を決定し、SI の算出を行った。

結果：2 つの漢方方剤は、同等の抗マラリア活性を示し、ともに強い細胞傷害性は検出されなかった。また、Dd2 に対しても抗マラリア活性を示した（表 4）。

考察：両者はほぼ同等の効果を示したが、続く動物実験にはより多量の方剤が必要であったため、必要量の入手が可能であった黄連解毒湯を、まず検討に用いることとした。

漢方方剤名	IC ₅₀ (μg/mL)		CC ₅₀ (μg/mL)	SI	
	3D7A	Dd2		3D7A	Dd2
三黄瀉心湯	41.0	89.0	> 1000	> 24.4	> 11.2
黄連解毒湯	36.0	104.0	> 1000	> 27.8	> 9.6

表 4：黄連を含む漢方方剤の抗マラリア活性検討結果(*in vitro*)

3) *In vivo* 実験での抗マラリア効果の検討：黄連解毒湯及び黄連の抗マラリア効果をマウスを用いて検討した。

方法：マウスマラリア *Plasmodium yoelii* を C57BL/6 マウスに感染させ、同日から黄連解毒湯及び黄連の感染マウスへの経口投与を開始した。黄連解毒湯の投与量は、ヒトへ用いられる際の体重当たり投与量の 10 倍とし、黄連は（黄連解毒湯の黄連含有率から）その 1/3 量とした。サンプルは 200 μ L の純水に溶解し、投与はゾンデを用いて 1 日 2 回行った。また、感染翌日より採血を行い、ギムザ染色により赤血球のマラリア感染率を測定した（図 1）。本実験系実験では、感染 6～7 日後より、純水コントロール群でマラリア感染赤血球の溶血が始まり赤血球数が減少する。このため、マラリア感染率が抗マラリア効果の指標として使用できるのは 6 日目までと考えている。また、これらの実験に先立ち、別のサンプル投与マラリア（非感染）マウス群を準備し、投与 1 時間後のマウスから採取した血漿について ODS カラムを用いた高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)により分析を行い、黄連含有化合物が検出されるかを検討した。

結果：LC-MS を用いた解析は、サンプル投与から採血までの時間など実験条件の最適化が出来ておらず、プレリミナリー実験として行ったものではあるが、berberine, palmatine, coptisine, の 3 化合物が検出された（表 5）。

また、マウスマラリアの治療実験では、純水コントロール群と比較して、黄連解毒湯及び黄連投与群でマラリア感染率の低下が認められた。しかしこの内、黄連投与群での感染率低下はわずかなものであった。また、投与期間中にマウスの活動性や体温の低下など問題点も認められた。これに対して、黄連投与群では、黄連解毒湯投与群よりも大きな感染率低下が認められ、また見た目には目立った問題点も見受けられなかった（図 2）。

考察：黄連解毒湯は、投与量が原因と考えられる問題が生じ、抗マラリア効果もそれほど強くなかったため、今後開発を継続するのかは検討が必要である。

これに対して、黄連投与群では黄連解毒湯投与群で見られたような問題も無く、またより大きな感染率の低下が確認された。しかしながら、この効果も既存薬であるクロロキンに比べると弱いものであったため、プロトコールの再検討など改善が必要であると考えられた。

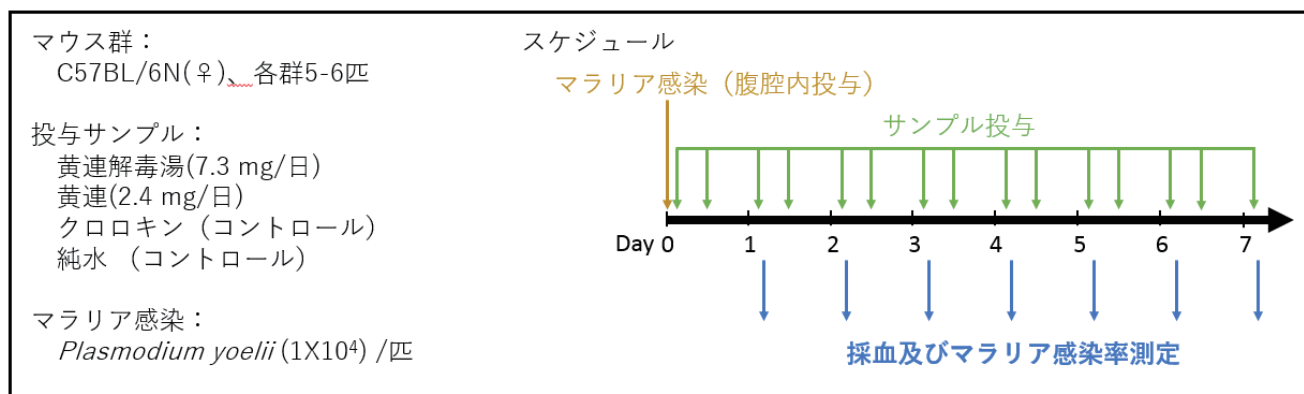


図 1：黄連を含む漢方方剤の抗マラリア効果検討(*in vivo*) 実験方法サマリー

化合物	m/z	黄連解毒湯投与マウス血漿					黄連投与マウス血漿				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
berberine	336.1	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○
palmatine	352.1	○	○	○	-	-	○	○	-	-	○
coptisine	320.1	△	-	○	-	△	○	○	-	-	○

表 5：黄連解毒湯・黄連投与マウス血漿中の黄連含有化合物の検出

C57BL/6 マウスに治療時と同量の黄連解毒湯・黄連経口投与を 1 回行い、投与後 1 時間後に採血を行った。血漿を分離し、化合物の検出を LC-MS を用いて行った。○：化合物シグナルを検出、△：化合物のものと考えられるシグナルを検出。

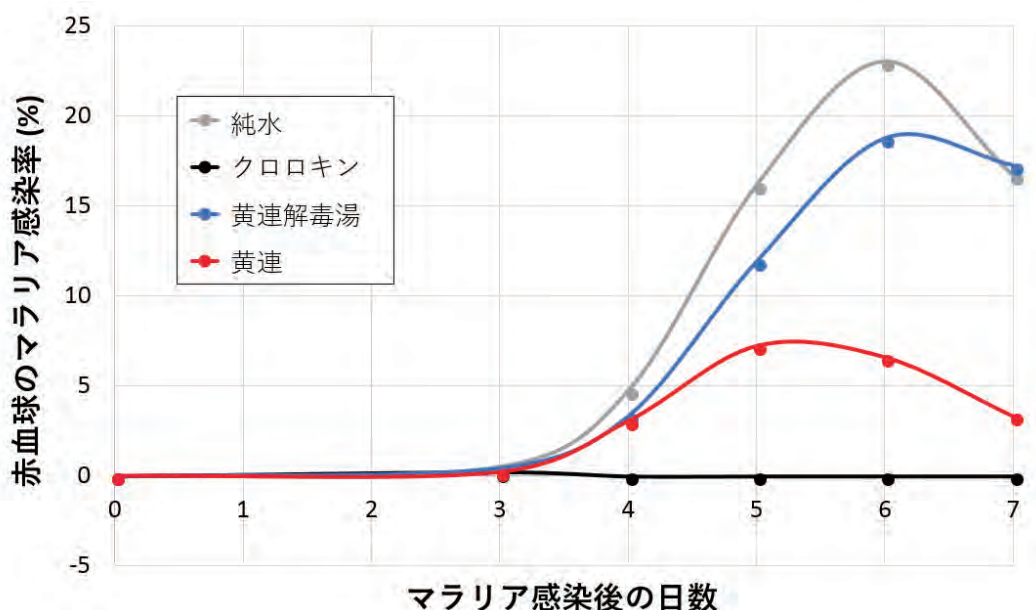


図 2：黄連を含む漢方方剤の抗マラリア効果検討(*in vivo*) 実験結果

■結論

本研究の結果、まず、和漢薬ライブラリーに含まれる多くの化合物・生薬エキ스가抗マラリア活性を有することが分かった。特に、黄連及び関連する化合物(coptisine chloride, berberine chloride, palmatine chloride)が優れた抗マラリア薬につながる可能性が見出された。

本研究では、抗マラリア活性を有する生薬やそれを含む方剤を抗マラリア薬として用いる可能性を検討した。*In vitro*において、黄連を多く含む方剤である三黄瀉心湯・黄連解毒湯（及び黄連）が、薬剤感受性マラリア株のみならず耐性株にも抗マラリア活性を示したのは良好な結果であった。

今回は、時間的な制約のため、黄連解毒湯と黄連のみマウスマラリアモデルで抗マラリア効果を検討した。

ヒトへ用いられる際の体重当たり投与量の 10 倍量を使用した影響からか、黄連解毒湯投与マウスでは活動性・体温の低下が見られた。また、コントロール群と比較したマラリア感染率の低下も大きくなかったことから、今後も研究に用いるかは検討が必要となった。これに対して、黄連投与群では上記のような問題点は確認されず、

抗マラリア効果も黄連解毒湯投与群より強かった。しかし、その効果もコントロールとして使用した既存薬であるクロロキンよりは弱かったため、投与量や投与間隔などプロトコルの再検討が必要と考えられた。

今後、黄連を含む方剤及び黄連の単味生薬を抗マラリア薬候補として考え、いかにこの和漢薬に基づいた抗マラリア薬開発を発展させて臨床に還元させるかを、引き続き検討していく予定である。